



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CAMPUS II – AREIA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA



**PESQUISA DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVO EM
QUEIJOS TIPO COALHO PRODUZIDOS COM LEITE CRU E
COMERCIALIZADOS EM TRÊS MUNICÍPIOS DO AGRESTE
PARAIBANO.**

Fábio José Targino Moreira da Silva Júnior

Areia Paraíba
Julho de 2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CAMPUS II - AREIA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PESQUISA DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVO EM
QUEIJOS TIPO *COALHO* PRODUZIDOS COM LEITE CRU E
COMERCIALIZADOS EM TRÊS MUNICÍPIOS DO AGRESTE
PARAIBANO.**

Fábio José Targino Moreira da Silva Júnior

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial
para a obtenção do título de Bacharel
em Medicina Veterinária pela
Universidade Federal da Paraíba,
sob orientação do professor Dr.
Felipe Nael Seixas.

Areia Paraíba
Julho de 2017

*Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.*

S586p *Silva Júnior, Fábio José Targino Moreira.*

Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo em queijos tipo coalho produzidos com leite cru e comercializados em três municípios do agreste paraibano / Fábio José Targino Moreira Silva Júnior - Areia: UFPB/CCA, 2017.

26 f.: il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2017.

Bibliografia.

Orientador(a): Prof. Dr. Felipe Nael Seixas.

1. Microbiologia – Patógenos. 2. Microrganismos - Patogenicidade. 3. Queijo tipo coalho – Produção. I. Seixas, Felipe Nael (Orientador) II. Título.

UFPB/CCA

CDU: 579.67:613.288

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fábio José Targino Moreira da Silva Júnior

**PESQUISA DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVO EM QUEIJOS TIPO
COALHO PRODUZIDOS COM LEITE CRU E COMERCIALIZADOS EM TRÊS
MUNICÍPIOS DO AGRESTE PARAIBANO.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em Medicina
Veterinária, pela Universidade Federal da
Paraíba.

Aprovada em: 20/07/2017

Nota: 10,0

Banca Examinadora:

Professor Doutor Felipe Nael Seixas
Orientador UFPB/CCA/DCV

Professor Doutor Inácio José Clementino
UFPB/CCA/DCV

Mestra Vânia Vieira Reis
UFPB/CCA/DCV/Técnica de Laboratório

AGRADECIMENTOS

Aos espíritos de luz, amor e caridade, que me encaminharam pelo caminho da luta, da paz e da fé.

À minha mãe, fonte inesgotável de amor, meu coração fora de mim, pelo cuidado, carinho e atenção. Por ser a razão de todo meu esforço e da minha dedicação. Pela contribuição na minha formação, sendo meu exemplo de ser humano, de coragem, valentia e criatividade. Por tudo que passamos, sempre com muito amor e parceria, acreditando na minha capacidade quando nem ao menos eu acreditava, por abdicar de seus sonhos e desejos para que eu pudesse realizar todos os meus.

Aos meus irmãos, Renato e Heitor, por me permitirem crescer antes do tempo, e foi graças a vocês que essa caminhada foi mais fácil do que poderia ser, amo vocês.

Ao meu pai, Fábio José Targino, por inspirar e acreditar na minha capacidade.

Ao meu padrasto, José Edson, por acreditar na minha capacidade, por incentivar na prática da minha profissão e por fortalecer meus sonhos.

Aos meus familiares, avó Inadilze Targino, e aos avós *in memoriam*, avó Severina Gomes, vô Francisco Azevedo e Eduardo Torres, tias e tios, primos e primas, pela torcida, carinho, conselhos e ajuda na caminhada, vocês foram essenciais no conforto, nas ajudas.

Aos meus amigos, que mesmo na distância me ajudaram, me incentivaram e diziam o quanto acreditavam em mim, vocês foram essenciais, em especial á Flávia Rodrigues, Caize Pontes, Isabel Belmiro.

Aos meus colegas de turma e de curso, em especial, Ramon Okumura, Raul Antunes, Silmara Andrade, Fernanda Agnes, Gabriela Soares, Suelen Laís, Nailson Júnior, Jesus Cavalcante, José Alexandre, Aline Pinheiro, Rafael Barão, Iara Nóbrega, Lis Ramalho, Cely Raquel, Diego Alcoforado, Alysso Gurjão, Maurilio Kennedy, por terem assumido o papel de irmãos, de família. Jamais esquecerei cada noite de estudo, cada viagem, cada material compartilhado, os sonhos vividos e toda superação, assisti vocês crescerem, e a certeza que serão excelentes profissionais e serão fontes de muito orgulho e admiração, obrigado por tudo, pelos conselhos, ombros amigos e toda ajuda.

Aos amigos e companheiros que dividiram residência comigo, por terem sido minha família, com quem dividi as angústias, as contas, as alegrias, as farras e a vivência do cotidiano. Vocês fizeram com que praticasse o auto conhecimento, a empatia e me tornaram uma pessoa mais madura, obrigado Tamires Macêdo, Fernanda Fernandes, Segundo e Adriano.

Ao Professor e Orientador, Dr. Felipe Nael Seixas, por ter sido um dos maiores incentivadores, um amigo, sempre disponível a ajudar e contribuir, inspirando a seguir na área de inspeção sanitária de alimentos, a acreditar na minha capacidade e jamais hesitou quando pedi ajuda.

Ao Professor Dr. Inácio Clementino e Vânia Vieira por aceitarem o convite de estarem presentes na banca avaliadora desse trabalho, por serem parceiros nas dúvidas, nos conselhos e por contribuírem muito com a realização deste trabalho.

Aos professores e professoras do curso de Medicina Veterinária, vocês são à base de toda minha formação. Obrigado por inspirar-me e fazer crescer, por cada ensinamento, orientação, oportunidade e carinho, agradeço, em especial às Professoras Danila Campos, Anne Evelyne, Fabiana Satake, Silvanda de Melo Silva, Suzana Aparecida, Maurina Lima Porto, aos professores Luiz Eduardo e Danilo Stipp.

Aos técnicos e estudantes que fazem parte do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, por toda atenção, ajuda e contribuições. Em especial, agradeço à Vânia Vieira, Diogo Vieira e Luana Teles Ramos. À Rayene Maria, pela parceria na realização desse trabalho, por toda ajuda e carinho. A todos que contribuíram nas análises no laboratório e na coleta das amostras, em especial à Tamires Macêdo, Silmara Andrade, Ramon Okumura e Cely Raquel.

A UFPB, por permitir a formação profissional, garantindo estrutura e contribuindo na vida profissional.

Aos pacientes e seus tutores, foram essenciais para o processo de formação profissional, cederam suas dores, seus sentimentos, suas angústias para que pudesse aprender, mesmo sabendo de minha insegurança e inexperiência.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na concretização desse sonho.

MUITO OBRIGADO!

DEDICATÓRIA

Á minha mãe, Maria de Fátima de Lima Gomes, pelo incentivo, críticas, amor, dedicação, abdicação de seus sonhos pessoais para realizar os meus, pela sua história de superação e força de vontade. Á ela minha vida, por ela minhas conquistas e para ela todo meu amor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspectos morfológicos das colônias de <i>Staphylococcus</i> spp. inoculadas em meio Baird-Parker, incubadas invertidas em estufa á $26^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, após 24 horas, na diluição -3, da amostra 5, 2017.....	8
Figura 2 – Aspectos morfológico-tintoriais de <i>Staphylococcus</i> spp. da amostra 4, coloração de Gram vista ao aumento de 100X, 2017.....	8
Figura 3 - Prova de coagulase para pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em queijos tipo coalho produzidos e comercializados na macrorregião do Agreste paraibano, 2017.....	9
Figura 4 - Prova de coagulase para pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, demonstrando coágulo 4+ da amostra 2 (A) e coágulo 3+ da amostra 10 (B), 2017.....	9

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Contagem total (UFC/g) de <i>Staphylococcus</i> spp. em amostras de queijos tipo coalho produzidos com leite cru e comercializados em três municípios da macrorregião do Agreste Paraibano, nos períodos de Junho a Julho de 2017.....	7
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DTA – Doença Transmitida por Alimentos

CFU/g – Colony-forming units per gram

g - Grama

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IN – Instrução Normativa

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL – mililitros

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

PB – Paraíba

RDC – Regulamento da Diretoria Colegiada

SE – Enterotoxinas Estafilocócicas

SEBRAE - Serviço de apoio às micro e pequenas empresas

UFC/g – Unidade Formadora de Colônias por grama

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

RESUMO

SILVA JÚNIOR, Fábio José Targino Moreira, Universidade Federal da Paraíba, julho de 2017. **PESQUISA DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVO EM QUEIJOS TIPO COALHO PRODUZIDOS COM LEITE CRU E COMERCIALIZADOS EM TRÊS MUNICÍPIOS DO AGRESTE PARAIBANO.** Orientador: Felipe Nael Seixas

Nos municípios interioranos do estado da Paraíba é comum a venda informal de produtos lácteos e queijo. O queijo coalho artesanal é comercializado em feiras livres, padarias, lanchonetes e mercados, esse produto tem como matéria-prima o leite cru, sendo apreciado por uma grande parcela da população, podendo representar um grande risco para saúde pública. Devido à sua intensa manipulação durante a fabricação e o não tratamento térmico prévio do leite, um dos patógenos importantes é o *Staphylococcus* coagulase positiva. Objetivou-se pesquisar a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de queijos tipo coalho produzidos com leite cru e comercializados em três municípios da macrorregião do agreste paraibano. Foram examinadas 10 peças de queijos coalho, recolhidos aleatoriamente em diferentes pontos de comercialização nos municípios de Alagoinha, Areia e Remígio - PB, durante os meses de junho e julho de 2017. As amostras foram encaminhadas para análises no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva - UFPB. A enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva seguindo a metodologia do Standard Methods for Examination of Dairy Products. As 10 amostras examinadas apresentaram *Staphylococcus* spp. tendo como média $1,11 \times 10^5$ UFC/g, das quais 100% (10/10) das amostras apresentaram *Staphylococcus* coagulase positiva com uma média de $1,11 \times 10^5$, 50% (5/10) amostras apresentaram contagens acima de 10^5 , quantidade de *Staphylococcus* coagulase positiva considerada suficiente para produzir toxinas estafilocócicas e causar intoxicações alimentares.

Palavras-chave: higiene, patógenos, produtos lácteos.

ABSTRACT

SILVA JÚNIOR, Fábio José Targino Moreira, Universidade Federal da Paraíba, July, 2017. **RESEARCH OF POSITIVE COAGULASE *Staphylococcus* IN COALHO TYPE CHEESE PRODUCED WITH RAW MILK AND MARKETED IN THREE MUNICIPALITIES OF PARAIBANO AGRESTE.** Adviser: Felipe Nael Seixas

In small cities of the state of Paraíba, informal sale of dairy products and cheese is common. The artisanal coalho cheese is marketed in fairs, bakeries, snack bars and markets, this raw material is raw milk, being appreciated by a large part of the population and may pose a great risk to public health. Due to its intense handling during the manufacture and the non-heat treatment of milk, one of the important pathogens is *Staphylococcus* coagulase positive. The objective of this study was to investigate the presence of coagulase positive *Staphylococcus* in samples of rennet cheeses produced with raw milk and marketed in three municipalities of the macroregion of the Paraíba agreste. Ten samples of rennet cheeses were randomly collected at different marketing points in the municipalities of Alagoinha, Areia and Remígio - PB, during the months of June and July 2017. The samples were sent to the Laboratory of Preventive Veterinary Medicine - UFPB. The enumeration of *Staphylococcus* coagulase positive following the methodology of the Standard Methods for Examination of Dairy Products. The 10 samples examined showed *Staphylococcus* spp. With a mean of 1.11×10^5 CFU / g, of which 100% (10/10) of the samples had *Staphylococcus* coagulase positive with a mean of 1.11×10^5 , 50% (5/10) samples showed counts above 10^5 , amount of *Staphylococcus* Coagulase positive enough to produce staphylococcal toxins and cause food poisoning.

Key words: dairy products, hygiene, pathogen.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	2
2.1. Fabricação de queijo.....	2
2.2. Microbiota bacteriana presente em queijos produzidos com leite cru.....	2
2.3. Microrganismos indicadores.....	3
2.4. <i>Staphylococcus spp.</i>	4
2.5. Padrões microbiológicos do Queijo Coalho.....	5
3. Materiais e métodos.....	6
4. Resultados e Discussão.....	8
5. Conclusões.....	11
6. Referências Bibliográficas.....	12

1. Introdução

O Brasil é atualmente o quarto maior produtor de leite no mundo, estando atrás apenas dos Estados Unidos, da Índia e da China (FAO, 2013). No ano de 2015, a produção de leite foi de 35 bilhões de litros, sendo 4 bilhões produzidos no Nordeste. Do total produzido pelo Brasil, 31,3 % é produzido sem fiscalização ou inspeção (IBGE, 2015).

Conforme dados demográficos do IBGE (2010), a Macrorregião do Agreste Paraibano está localizada à retaguarda da Macrorregião da Mata Paraibana, é formada pela união de 66 (sessenta e seis) municípios agrupados em 8 (oito) microrregiões: Brejo Paraibano, Campina Grande, Curimataú Ocidental ou Cuité, Curimataú Oriental ou Araruna, Esperança, Guarabira, Itabaiana e Umbuzeiro.

A qualidade microbiológica do leite cru influencia significativamente a qualidade final dos derivados. Boa parte dos microrganismos presentes no leite cru é incluída no momento da ordenha, mas a contaminação pode ocorrer também durante sua estocagem na propriedade, seu transporte e seu processamento.

A legislação brasileira não autoriza a comercialização de leite cru, e os requisitos microbiológicos para comercialização do leite e sua utilização na fabricação de subprodutos são regidas pela IN 62 (BRASIL, 2011), bem como pela Portaria 146 de 1996, que estabelece os padrões de identidade e qualidade dos queijos (BRASIL, 1996) e a RDC 12 de 2001, que define os padrões microbiológicos dos alimentos (BRASIL, 2001b). Apesar disto, é comum a produção, comercialização e distribuição de produtos informais e clandestinos, sem passarem por serviço de inspeção, sem rastreabilidade ou controle de sua produção.

Contemplando a importância do consumo de leite e seus derivados na nutrição humana, o consumo de produtos clandestinos e informais que estejam contaminados representam um grande risco a saúde pública.

Objetivou-se com este trabalho isolar, quantificar as bactérias *Staphylococcus coagulase positivo* em queijos coalho produzidos com leite cru e comercializados em três municípios da macrorregião do agreste paraibano.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Fabricação de queijo

De acordo com Beresford et al. (2001) a fabricação da maioria das variedades de queijos envolve a combinação de quatro ingredientes principais: leite, coalho, microrganismos e sal, que são processados através de uma série de passos comuns, tais como formação de gel, expulsão do soro, produção de ácido e adição de sal, seguido por um período de maturação. Variações nas misturas de ingredientes e o processamento subsequente conduziram à evolução de uma variedade de queijos.

Dentre estes o queijo de Coalho, considerado produto típico nordestino, é um queijo de massa crua ou semi-cozida, produzido há mais de um século a partir de leite de vaca cru e/ou pasteurizado (BRASIL, 2001a). Na Paraíba em 2008, a produção dos queijos de coalho e de manteiga girou em torno de 25 toneladas por mês, sendo o queijo coalho representante de 38% dessa produção (SEBRAE, 2008). A grande maioria desses produtos é obtida de forma artesanal e suas características sensoriais e organolépticas variam de acordo com o local onde são produzidos, pois normalmente são adotados processos de elaboração diferentes (CARVALHO, 2007).

O consumo do queijo coalho artesanal faz parte do hábito alimentar, principalmente nos estados do Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba, como também nos grandes centros da região Sudeste do país, sendo fonte de renda e trabalho para uma parcela de pequenos e médios produtores.

2.2. Microbiota bacteriana presente em queijos produzidos com leite cru

Pesquisas realizadas nos estados de Minas Gerais, Sergipe, Santa Catarina, Bahia e Rio Grande do Norte na última década, em queijos artesanais produzidos com leite cru, demonstraram a ocorrência de produtos impróprios para o consumo humano, por apresentarem *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (NASSU et. al., 2006; ROSSI et. al., 2007; SANTANA et. al., 2008; MENEZES et. al., 2009).

Essa microbiota patogênica é decorrente principalmente das condições sanitárias desde a obtenção ao processamento do queijo, estando relacionadas à presença de doenças nos animais, manipuladores, ambiente de manipulação e processamento do queijo, forma de exposição do produto durante a comercialização, além da falta de condições adequadas de armazenamento.

Os contaminantes microbiológicos mais frequentemente encontrados são fungos, vírus, bactérias, além de macrorganismos como moscas, carrapatos e larvas de mosquitos. Isso tudo pode ocasionar doenças na população e estudos da Organização Mundial da Saúde (OPAS, 2009), comprovam a existência de sete doenças viróticas básicas e 16 doenças bacterianas veiculadas pelo leite, destacando-se: rickettsioses (febre Q), infecções e intoxicações bacterianas (tuberculose, brucelose, listeriose, clostridioses), intoxicações alimentares (principalmente devido à toxina do *Staphylococcus aureus*), febres tifóide e paratifóide, salmonelose e intoxicações estreptocócicas (ABRAHÃO et. al., 2005).

2.3. Microrganismos indicadores

Microrganismos indicadores são grupos que tem uma origem específica ou crescem em determinadas circunstâncias, de forma que a presença em determinados alimentos indiquem condições favoráveis ao seu crescimento (BELOTI et. al., 2015) podendo avaliar higienicamente e sanitariamente a cadeia de produção, distribuição e comercialização desses produtos.

Decorrente da utilização de matérias primas e de processamento inadequado, os queijos produzidos em pequenas fábricas, ou artesanalmente, apresentam, em geral, uma grande quantidade de microrganismos responsáveis pela deteriorização e/ou redução da vida útil do produto, indicadores de más condições higiênicas sanitárias do processamento além da manipulação inadequada da matéria prima, dos utensílios e equipamentos (PEIXOTO et al., 2007).

Assim faz-se necessário, para um maior controle de qualidade, com padrões higiênicos sanitários, a identificação de microrganismos indicadores de condições higiênicas sanitárias, que irão fornecer informações da ocorrência de contaminantes, com a possibilidade de entre esses microrganismos, encontrar-se agentes patogênicos. Quando presente em um número considerável é um indicador de falhas

no processo de fabricação/manipulação.

Os microrganismos indicadores podem ser adicionados ao produto final por diversos pontos de contaminação, a própria matéria prima, os manipuladores, as estruturas e utensílios higienizados inadequadamente e a exposição inadequada na comercialização (BELOTI et al., 2015).

2.4. *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* (GARRITY; HOLT, 2001). É composto por cocos Gram positivos, usualmente catalase positivos que, geralmente, metabolizam a glicose de forma oxidativa e fermentativa. Neste gênero se incluem até 49 espécies e 26 subespécies (EUZÉBY, 2007). As espécies do gênero *Staphylococcus* são classificadas em grupos de acordo com a capacidade de sintetizar a enzima coagulase. O grupo dos *Staphylococcus* coagulase positiva é composta por 8 espécies (*S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. pseudointermedius*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. hyicus* e *S. agnetis*). As demais espécies não coagulam o plasma e são denominadas de *Staphylococcus* coagulase negativa.

Os *Staphylococcus* coagulase positiva habitam a pele humana, estando presente nas fossas nasais e boca, os alimentos contaminados com esses microrganismos são decorrentes do contato das mãos dos manipuladores com o nariz, boca e couro cabeludo. A presença desse microrganismo está relacionada à manipulação inadequada, além do leite cru, pois o *Staphylococcus aureus* é um dos agentes etiológicos da mastite bovina (BELOTI et al., 2015).

A legislação brasileira vigente estabelece como tolerância para amostra indicativa por análise de 5×10^2 UFC/g para contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (BRASIL, 2001b).

As vias de contaminação dos queijos podem ser o leite, o manipulador e o ambiente de processamento. No leite cru, a principal fonte de contaminação provém da mastite bovina, na qual *Staphylococcus* coagulase positiva é o principal agente etiológico (SOUSA et. al., 2014).

Os estafilococos devem ser utilizados quando se quer saber sobre o comportamento higiênico dos manipuladores com relação ao alimento. Decorrente

do mau crescimento em superfícies que normalmente são utilizados na produção de alimentos, os estafilococos não indicam contaminação de ambientes ou equipamentos (BELOTI et. al., 2015).

Do ponto de vista de segurança de alimentos e saúde humana, o queijo é um alimento no qual *S. aureus* é propenso a desencadear importantes problemas de saúde pública. A Presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos é fator preocupante, principalmente quando atingem contagens iguais ou superiores a 10^6 UFC/g, pois se considera que a partir deste valor, e sendo toxigênicos, a quantidade de toxina produzida será suficiente para causar sintomas de gastroenterite, aumentando o risco de ocorrência de intoxicação estafilocócica (SANTANA, 2006; FREITAS, 2013). Essas bactérias, quando presentes em populações elevadas (1×10^5 UFC mL ou g) e sob condições adequadas (temperatura, pH, atividade de água e O_2), produzem uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas (SE) nos alimentos, as quais depois de ingeridas causam intoxicação (BORGES et. al. 2008).

A intoxicação estafilocócica é uma das causas mais frequentes de surtos de doenças transmitidas por alimentos, em vários países. Surtos e casos de intoxicação são atribuídos principalmente aos produtos lácteos, entre eles, os queijos são os principais. No Brasil, esses surtos são relacionados ao consumo de queijos tipo Minas Frescal, queijo Minas (CARMO et al., 2002; INPPAZ/OPS/OMS, 2006), e queijo coalho (INPPAZ/OPS/OMS, 2006).

2.5. Padrões microbiológicos do Queijo Coalho

A presença dos microrganismos que normalmente são encontrados no queijo coalho é decorrente, principalmente, da falta de Boas Práticas de Fabricação desse alimento (SANTANA et al., 2008), da ausência de higiene na obtenção do leite, que é a principal matéria prima do queijo coalho, das más condições de manipulação, evidenciando a falta de higienização das mãos, a contaminação da água, a falta de higienização das superfícies de exposição do produto para produção e comercialização.

Decorrente de uma diversidade de produção do queijo coalho e da falta de padronização da qualidade microbiológica deste alimento, o Ministério da Saúde,

através da RDC 12/2001 da ANVISA, estabelece os padrões microbiológicos para os alimentos, entre eles, o queijo coalho (BRASIL, 2001b).

A RDC 12/2001 estabelece como padrão microbiológico para o queijo coalho, uma tolerância de 5×10^2 Número Mais Provável por grama (NMP/g) da amostra para Coliformes a 45°C e 5×10^2 (UFC/g) de *Estafilococos* coagulase positiva, bem como, ausência de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* (BRASIL, 2001b).

O cumprimento dos padrões microbiológicos estabelecidos na legislação é essencial para garantia da saúde pública. Considerando os *Staphylococcus* coagulase positiva, estes, são patógenos importantes por causarem intoxicações resultantes da produção de enterotoxinas termoestáveis e pré-formadas (Su; Wong, 1997),

3. Material e Métodos:

3.1 Amostragem

Foram utilizados para análises, 10 queijos tipo *Coalho* produzidos com leite cru de vaca, recolhidos aleatoriamente em diferentes pontos de comercialização (mercado público, padarias e armazéns) dos municípios de Alagoinha, Areia e Remígio, localizados na região do agreste paraibano.

As amostras foram identificadas (hora/dia/local), avaliadas visualmente as condições de armazenamento, exposição e higiene na manipulação do produto. Evidenciando que os queijos obtidos, eram, em sua maioria, expostos sob refrigeração, expostos juntos a outros produtos alimentícios, principalmente carnes e seus derivados, em embalagens impróprias. Observou-se, por parte dos manipuladores e atendentes, a manipulação dos queijos sem a limpeza ou higienização das mãos, além da não utilização de luvas e tocas. Nos locais, observava presença de pragas e não havia local para higienização das mãos.

As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e encaminhadas ao laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal da Paraíba, Campus-II, Areia.

De cada queijo separou-se frações de 5 g, de vários pontos da amostra coletada, totalizando 25 g, para cada uma das análises a serem realizadas nos

exames microbiológicos.

3.2 *Staphylococcus* coagulase positivo

A enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva seguindo a metodologia do Standard Methods for Examination of Dairy Products.

Uma alíquota de 25g dos queijos avaliados foi adicionada a 225 ml de água peptonada 0,1%, e homogeneizada por 60 segundos, obtendo-se a diluição 10^{-1} e, desta, foram obtidas as demais diluições em água peptonada 0,1%. Para quantificação de *Staphylococcus* coagulase positivo, 0,1 mL da diluição escolhida (10^{-2} e 10^{-3}) de cada amostra que foi inoculada na superfície seca de placas de ágar Baird-Parker em duplicata, com o auxílio da alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado por toda a superfície do meio até sua completa absorção. As placas foram incubadas invertidas em estufa a 35/37° C por 24 horas. Para contagem foram selecionadas as placas que apresentaram entre 25 a 250 colônias típicas e atípicas e o resultado foi dado em UFC/g, e destas selecionou-se 3 colônias e repicadas em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) a 35/37° C por 6 horas, foram isoladas inoculando-as em Agar Baird-Parker e em seguida, realizada a prova da coagulase.

3.2.1 Prova de Catalase

Foram selecionadas colônias com características típicas e atípicas, onde realizou-se a prova de catalase. Transferiu-se uma alíquota das colônias selecionadas, para uma placa de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3 %, em seguida procedeu-se a mistura do inóculo ao peróxido utilizando uma alça de platina previamente flambada, observou-se a reação de formação de borbulhas.

3.2.2 Coloração de Gram

Para observação da morfologia bacteriana e arranjo das bactérias isoladas utilizou-se a técnica de coloração de Gram, sendo realizada após as 24 horas de incubação em meio Agar Baird-packer, onde foram confeccionados esfregaços de colônias típicas e atípicas, em seguida observou-se as características morfológicas,

registrou-se fotograficamente.

3.2.3 Prova de Coagulase

Para confirmação como *Staphylococcus* coagulase positivo realizou-se a prova de Coagulase. Utilizando o plasma de coelho (Laborclin, Pinhais, PR), onde foi transferido 0,5 mL do plasma para um tubo de ensaio acrescentando posteriormente 3 colônias típicas, obtidas do cultivo em meio Baird-parker, incubou-se em estufa a 35/37° C por 4 horas, em seguida procedeu à leitura.

4. Resultados e Discussão

Os queijos eram comercializados em embalagens impróprias, sem rotulagem, não indicando data de fabricação e validade, não apresentando selo de serviço de inspeção, com peso médio de 200 gramas. Todos os queijos foram coletados entre o período de 06:00 horas da manhã até as 12:00 horas da tarde.

Tabela 1. Contagem total (UFC/g) de *Staphylococcus* spp. e classificação na prova de coagulase, em amostras de queijos tipo coalho produzidos com leite cru e comercializados em três municípios da macrorregião do Agreste Paraibano, nos períodos de Junho a Julho de 2017.

Amostras de Queijos	UFC/g	Coagulase
Q 1	$4,8 \times 10^4$	4+
Q 2	$1,98 \times 10^5$	4+
Q 3	$8,7 \times 10^4$	4+
Q 4	$1,11 \times 10^5$	3+
Q 5	$1,69 \times 10^5$	4+
Q 6	$2,4 \times 10^4$	2+
Q 7	$6,75 \times 10^4$	3+
Q 8	$1,21 \times 10^5$	2+
Q 9	$2,5 \times 10^5$	4+
Q 10	$4,15 \times 10^4$	3+

Todos os queijos apresentaram *Staphylococcus* spp., em uma média de $1,11 \times 10^5$ UFC/g, os resultados de cada amostra estão apresentados na Tabela 1. sendo expressos em UFC/g .

A legislação brasileira permite um número de 5×10^2 UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo coalho (BRASIL, 2001b), neste sentido, 100% (10/10) das amostras analisadas neste trabalho estão fora dos padrões estabelecidos pela legislação.

Resultados apresentados por Santana (2008), em análise de 60 amostras de queijo coalho na cidade de Aracajú, Sergipe, demonstraram que 28 amostras (46,7%) foram positivas para estafilococos coagulase positiva. Borges et al. (2008) verificaram contagens elevadas de *S. aureus* entre $1,2 \times 10^7$ e $2,7 \times 10^7$ UFC/mL, em 25 amostras de leite cru no estado do Ceará. Freitas et. al. (2013) avaliou nove amostras de queijo coalho de produtores de três regiões diferentes do estado da Paraíba, encontrando contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras dos três produtores. As contagens variaram de $4,0 \times 10^2$ a $1,2 \times 10^6$ UFC/g, os autores acreditam que a utilização de leite cru contaminado com *Staphylococcus* coagulase positiva pode ter contribuído para esse resultado. No trabalho foram observadas 100% (10/10) da amostras positivas para *Staphylococcus* coagulase positiva, com contagem média de $1,11 \times 10^5$ UFC/g, variando entre $2,4 \times 10^4$ a $2,5 \times 10^5$.

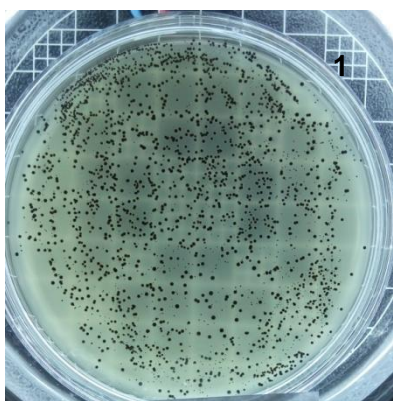


Figura 1. Aspectos morfológicos das colônias de *Staphylococcus* spp. inoculadas em meio Baird-Parker, incubadas invertidas em estufa á $26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, após 24 horas, na diluição -3 da amostra 5, 2017.

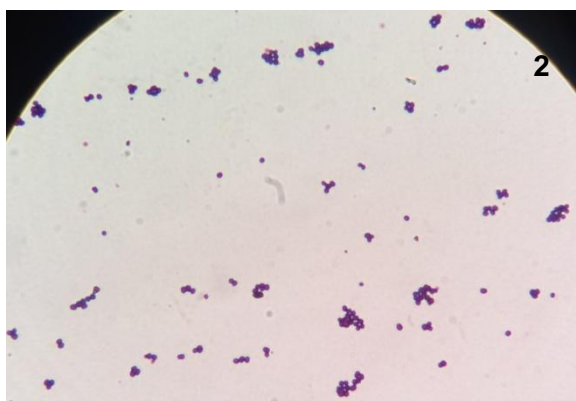


Figura 2. Aspectos morfológico-tintoriais de *Staphylococcus* spp. da amostra 4, coloração de Gram vista ao aumento de 100X, 2017

As colônias típicas apresentavam-se como negras brilhantes com anel opaco, presença de halos claros ou transparentes, que se destacavam na opacidade do meio Baird-packner, de diferentes tamanhos das colônias, como demonstrado na Figura 1.

Em relação à coloração de Gram, 100% (10/10) das amostras analisadas, apresentavam características de coloração Gram positiva, com morfologia de cocos arranjados em cachos, como observado na Figura 2. Já na prova de catalase 100% (10/10) das amostras avaliadas foram positivas, evidenciando que essas bactérias eram do grupo *Staphylococcus* spp.



Figura 3. Prova de coagulase para pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos tipo coalho produzidos e comercializados na macrorregião do Agreste paraibano, 2017.

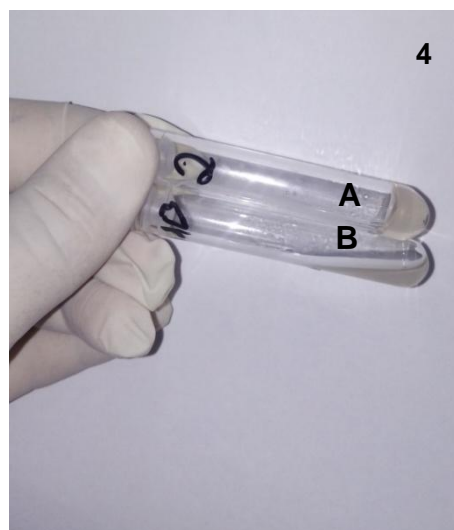


Figura 4. Prova de coagulase para pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva, demonstrando coágulo 4+ da amostra 2 (A) e coágulo 3+ da amostra 10 (B), 2017.

Dentre as amostras avaliadas na prova de coagulase, demonstradas na Figura 3 e Figura 4, 100% (10/10) coagularam. Dessas, 5 (cinco) apresentavam-se como coágulos de todo conteúdo do tubo, que não se desprendia quando a amostra era invertida e 3 (três) apresentavam coágulos grandes e organizados, enquanto, 2 (duas) apresentavam coágulo grandes e desorganizados, segundo Beloti et. al. (2015) coágulos que apresentem essas características são atribuídos pontuações de 4+, 3+ e 2+, respectivamente. A classificação na prova de coagulase é apresentada na Tabela 1. Os coágulos 4+ e 3+ são indicativos para *Staphylococcus aureus*

(BELOTI et al. 2015), sendo essa a espécie de *Staphylococcus* coagulase positiva mais envolvida com surtos de intoxicação alimentar.

A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos é um fator preocupante, principalmente quando atingem contagens iguais ou superiores a 10^6 UFC/g, pois considera-se que a partir deste valor, e sendo toxigênicos, a quantidade de toxina produzida será suficiente para causar sintomas de gastroenterite, aumentando o risco de ocorrência de intoxicação estafilocócica (CARMO et al. 2002; SANTANA, 2006; FREITAS, 2013), porém, Borges et. al. (2008) consideram uma contagem igual ou superior a 10^5 UFC/g, relacionadas as condições ambientais, como produtora de toxinas suficiente para causar intoxicação nos consumidores desses produtos. Neste sentido, 50% (5/10) das amostras contaminadas com *Staphylococcus* coagulase positiva, apresentavam contagens acima de 10^5 UFC/g, podendo estar produzindo toxinas com potencial toxigênico.

5. Conclusões

Os queijos tipo coalho produzidos e comercializados na mesorregião do agreste paraibano apresentaram alta contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, decorrente, provavelmente, de uma manipulação inadequada em sua cadeia produtiva e/ou da utilização de leite cru contaminado na sua fabricação, sendo impróprio para consumo.

Através deste trabalho fica evidente a necessidade de ações educativas com a população que consome este produto, a fim de sensibilizar quanto ao risco da ingestão desse alimento, quando contaminado. É essencial a realização de ações com os produtores de leite e de queijo desta região, cooperando para produção de um produto regional, seguro e inócuo, que não apresente risco a população.

Sugere-se a realização de pesquisas que avaliem e quantifiquem a presença de SE nos queijos coalhos produzidos e comercializados nessa região.

Faz-se necessária uma atuação da vigilância sanitária municipal, a fim de fiscalizar os estabelecimentos que comercializam esses produtos e realizar educação permanente para os comerciantes, quanto à correta manipulação do queijo coalho artesanal.

6. Referências bibliográficas:

ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco de transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.2, p.1-17, 2005.

BELOTI, V; TAMANINI, R; NERO, L. A. et. al. **Leite: Obtenção, inspeção e qualidade** Londrina: Editora Planta, 2015

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; et al. Recents advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**. v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.

BORGES, M. F.; NASSUL, R. T. ; PEREIRA, J. L. et. al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1431-1438, ago, 2008

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 mar. 1996, Seção 1, p.3977-3978.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa Nº 30, de 26 de junho de 2001. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga**. Diário Oficial da União de 16/07/2001, Seção 1 , Página 1. Brasília: 2001a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. **Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. p.1-54. Brasília: 2001b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 20 de setembro de 2011. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel**. Diário Oficial da União, 30 dez. 2011. Seção 1, p.6.

CABRAL, T.M.A. **Coliformes totais e fecais, e *Staphylococcus aureus* enteropatogênico em queijo de "coalho" comercializado no município**

de João Pessoa, PB. 1993. 88f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**. v. 19, p. 9-14, 2002.

DANTAS, D. S. **Qualidade Microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município de Patos, PB.** Patos, 2012, 79p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos.

EMPRAPA. **Panorama do leite.** Juiz de Fora, n.75, p.1-14, out. 2015.

FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations. Faostat. **Countries by commodity.** 2013.

FREITAS, W. C.; TRAVASSOS, A. E. R.; MACIEL, J. F. Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de coalho produzidos no estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v. 15, n. 1, p. 35-42, 2013.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** 5. ed. rev. e atual. Barueri, SP, Manole, 2015

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal** / IBGE - V.43 (2015) Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br [Julho 2017] 2015.

Instituto Panamericano de Protección de los alimentos y zoonosis (INPPAZ) / Organización Panamericana de la Salud (OPS) / Organización Mundial de La Salud (OMS) **Vigilancia Epidemiológica** Sistema de información regional para La vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos (SIRVETA). Acessado em 16 jul. de 2017. Disponível em: <http://www.panalimentos.org/sirveta/e/salida2.asp>

JABLONSKI, L. M; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: **Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers.** 2 ed. ASM Press-Washington.. p.411-434. 2001.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology.** 7 ed. ASPEN, Publishers, Gaithersburg, MD. 2005, 854pp.

KONEMAN, E. K.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. et al. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.** 5 ed. Lippincott, NY, 1395 p., 1990.

MENEZES, L.D.M.; PENA, E.C.; SOUZA, V.F. et al. Avaliação microbiológica do queijo Minas artesanal produzido em Minas Gerais em 2008. In: XVI ENCONTRO NACIONAL E II CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS. 16., 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2009. CD ROM.

NASSU, R.T.; ANDRADE, A.A.; SILVA, A.C. *et al.* Caracterização físico-química de queijos regionais produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. . In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS. 23., 2006, Juiz de Fora, MG. **Anais...** Juiz de Fora: CT/ILCT – EPAMIG, 2006. CD ROM.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Guias para o gerenciamento dos riscos sanitários em alimentos.** Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS, 2009.

ROSSI, E.M.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B. *et al.* Contagem de coliformes fecais e *Staphylococcus aureus* e pesquisa de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em queijos coloniais comercializados em feiras livres de São Miguel do Oeste – SC. **Higiene Alimentar**, v. 21, n. 150, p. 126-127, 2007.

SANTANA, E. H.W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Estafilococos: morfologias das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 639-646, 2006.

SANTANA, R.F.; SANTOS, D.M.; MARTINEZ A.C.C. et al. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p.1517-1522, 2008.

SEBRAE/PB. **Perfil tecnológico das queijeiras no cariri e agreste paraibano.** Serviço de apoio às micro e pequenas empresas do Estado da Paraíba. João Pessoa, 2008.

SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Current perspectives on detection of Staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, v.60, n.2, p.195-202, 1997.